

Maisons-Alfort, le 17 novembre 2014

LE DIRECTEUR GENERAL

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'homologation de la préparation fongique JUMPSTART WP, à base de deux souches de *Penicillium bilaii*, de la société NOVOZYMES BIOLOGICALS

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a notamment pour mission l'évaluation des dossiers de matières fertilisantes et supports de culture.
Les avis formulés par l'Agence comprennent :
- *l'évaluation des risques sanitaires que l'utilisation de ces produits peut présenter pour l'homme, l'animal ou l'environnement ;*
- *l'évaluation de leur efficacité sur les végétaux ainsi que celle de leurs autres bénéfices éventuels ;*
- *une synthèse de ces évaluations assortie de recommandations portant notamment sur leurs conditions d'emploi.*

PRESENTATION DE LA DEMANDE

L'Agence a accusé réception d'une demande d'homologation de la préparation fongique JUMPSTART WP déposée par la société NOVOZYMES BIOLOGICALS, pour laquelle, conformément à l'article R.255-1-1 du Code rural et de la pêche maritime, l'avis de l'Anses est requis.

Le présent avis porte sur la préparation fongique JUMPSTART WP à base de spores de *Penicillium bilaii* issues de deux souches et formulée avec différents diluants. Les souches P201 et P208 sont des souches naturelles, isolées à partir de sols canadiens et australiens respectivement.

Cette préparation est destinée à améliorer la solubilisation du phosphore des sols.

Cet avis est fondé sur l'examen par l'Agence du dossier déposé pour cette préparation microbienne, conformément aux exigences du Code rural et de la pêche maritime, de l'arrêté du 21 décembre 1998 et du guide pour l'homologation des Matières Fertilisantes et Supports de Culture (Document Cerfa 50644#01) et sous réserve de l'utilisation du produit dans le respect des bonnes pratiques agricoles (BPA).

SYNTHESE DE L'EVALUATION

Les données prises en compte sont celles qui ont été jugées valides par l'Anses. L'avis présente une synthèse des éléments scientifiques essentiels qui conduisent aux recommandations émises par l'Agence et n'a pas pour objet de retracer de façon exhaustive les travaux d'évaluation menés par l'Agence.

Après évaluation de la demande, réalisée par la Direction des Produits Réglementés avec l'accord d'un groupe d'experts du Comité d'experts spécialisé "Matières Fertilisantes et Supports de Culture", l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet l'avis suivant.

CONSIDERANT L'IDENTITE DU PRODUIT

La caractéristique garantie pour la préparation fongique JUMPSTART WP est la suivante (sur produit brut) :

Caractéristique	Valeur garantie selon la déclaration du pétitionnaire
Teneur de l'inoculum *Penicillium bilaii*	Minimum $7,2.10^{8}$ ufc[1] par gramme de produit

Cette préparation est proposée pour une utilisation en enrobage de semences. Elle se présente sous forme de poudre, à diluer dans l'eau avant application.

L'effet revendiqué par le pétitionnaire concerne l'amélioration de la solubilisation du phosphore des sols.

Usages et conditions d'emploi demandés (formulaire cerfa n°11385 du 23 décembre 2013) :

<table>
<tr><th rowspan="2">Cultures</th><th rowspan="2">Quantité de semences inoculées avec une bouteille de 80 g</th><th rowspan="2">Quantité de semences inoculées avec une bouteille de 400 g</th><th colspan="2">Nombre de germes par hectare (ufc.ha^{-1})</th><th rowspan="2">Nombre d'apports par an</th><th colspan="2">Volume de dilution (L)</th><th rowspan="2">Epoques d'apport</th></tr>
<tr><th>minimal</th><th>maximal</th><th>bouteille de 80 g</th><th>bouteille de 400 g</th></tr>
<tr><td>Maïs</td><td>1120000 grains</td><td>5600000 grains</td><td>$4,7.10^{9}$</td><td>$5,4.10^{9}$</td><td rowspan="4">1</td><td>3,92</td><td>19,6</td><td>Au semis</td></tr>
<tr><td>Blé tendre / Blé dur</td><td rowspan="2">1630 kg</td><td rowspan="2">8150 kg</td><td rowspan="2">$2,7.10^{9}$</td><td rowspan="2">$6,1.10^{9}$</td><td>10</td><td>50</td><td rowspan="2">Au semis (hiver ou printemps)</td></tr>
<tr><td>Orge</td><td>10</td><td>50</td></tr>
<tr><td>Colza</td><td>90 kg</td><td>455 kg</td><td>$9,0.10^{8}$</td><td>$1,9.10^{9}$</td><td>2</td><td>10</td><td>Au semis</td></tr>
</table>

La dose maximale d'apport prise en compte pour l'évaluation de l'innocuité de l'inoculum est de 400 g par hectare et par an.

CONSIDERANT LA CARACTERISATION DU PRODUIT ET LA QUALITE DE LA PRODUCTION

Caractérisation du produit et procédé de fabrication

Les spécifications de la préparation JUMPSTART WP telles que décrites sur le formulaire Cerfa 11385 (arrêté du 21/12/98, annexe I) et la fiche d'information permettent de caractériser cette préparation et sont conformes aux exigences réglementaires.

Le procédé de production de la préparation JUMPSTART WP repose sur la culture de l'inoculum *Penicillium bilaii* en conditions stériles. Chaque lot de commercialisation correspond à une bouteille de 80 ou 400 g de poudre d'inoculum.

Le système de management de la qualité de la fabrication et de la traçabilité des matières premières et des lots de production est décrit de manière complète et considéré comme satisfaisant. Ainsi, chaque lot de JUMPSTART WP est vérifié pour s'assurer qu'il est conforme à la spécification concernant le comptage de *Penicillium bilaii* (minimum de $7,2 \times 10^{8}$ ufc par g de

---
[1] ufc = unité formant colonie

produit). Par ailleurs, le maintien des souches en banque de collection permet un contrôle régulier et la vérification de l'absence de dérive génétique au cours du temps.
La gestion des non-conformités est considérée comme pertinente.

Les attestations croisées de fourniture et d'approvisionnement sont présentées de manière exhaustive pour ce qui concerne les sources des matières premières. Toute autre provenance correspondrait à un changement de composition et nécessiterait une évaluation complémentaire.

La souche P201 de *P. bilaii* est une souche isolée à partir de sols canadiens. Elle est enregistrée à l'ATCC[2] sous le numéro ATCC 20851 et par l'Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL n°50169.).
La souche P208 de *P. bilaii* a été découverte et isolée à partir de sols australiens et est enregistrée par l'Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL n°50162).

Le demandeur déclare que les souches P201 et P208 ne sont ni pathogènes, ni phytotoxiques et ne sont pas manipulées génétiquement.

Les matières premières, ainsi que le procédé de fabrication, ne présentent pas de dangers physico-chimiques particuliers.

Constance de composition du produit

La constance de composition du produit relative à sa richesse en spores de *Penicillium bilaii* est convenablement établie pour l'homogénéité et l'invariance.

La fiche d'information du produit ne précise pas de durée de conservation. Il est seulement reporté que le produit doit être stocké dans un endroit frais (< 20°C), à l'abri de la lumière du soleil et des sources directes de chaleur.

L'étude de stabilité montre que le produit est stable pendant 25 semaines à 15°C dans ces conditions.

Méthodes d'échantillonnage et d'analyse

La méthode d'échantillonnage utilisée dans le cadre du dossier technique pour constituer les échantillons soumis à l'analyse est pertinente compte tenu de la matrice considérée et des essais réalisés. Les analyses présentées ont été effectuées par un laboratoire accrédité par le COFRAC[3] sur le programme 108.

Les méthodes d'analyse mises en œuvre pour la caractérisation du produit sont acceptables.

L'appartenance des deux souches à l'espèce *P. bilaii* est démontrée par la méthode de séquençage de l'ADNr 28s (région D2). La méthode d'identification des souches P201 et P208 est basée sur le séquençage de la région D2 de l'ADNr 28s. Cette méthode permet une identification au niveau de l'espèce (*P. bilaii)* mais elle ne permet pas de discriminer les deux souches (P201 et P208).
L'identification au niveau de la souche a été réalisée par une méthode de croissance sur boite de Pétri avec un milieu sélectif. Cette méthode montre qu'un ensemencement sur boite de Pétri (7 jours à 25°C) contenant un milieu PDA[4] permet de différencier la souche 201 de la souche 208 (différence de diamètre des colonies et apparition d'un pigment jaune pour la souche 201).

Il est rappelé que, aux écarts admissibles près, la conformité de chaque unité de commercialisation du produit aux teneurs garanties sur l'étiquette est requise, et que ces écarts admissibles ne peuvent pas être exploités de manière systématique.

[2] ATCC = American Type Culture Collection
[3] COFRAC = Comité Français d'Accréditation
[4] Potato Dextrose Agar ou gélose dextrosée à la pomme de terre

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES A L'INNOCUITE DE LA PREPARATION FONGIQUE

Matières premières et procédé de fabrication

L'espèce *Penicillium bilaii* n'est pas inscrite sur la liste à l'annexe III de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail.

Compte tenu de la nature des autres matières premières dans le produit fini, il n'est pas attendu de danger pour l'homme et pour l'environnement.

Etude toxicologique de la préparation fongique

Les teneurs en éléments traces métalliques (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn) permettent de respecter les critères d'innocuité pour l'homologation des matières fertilisantes dans les conditions d'emploi préconisées.

Les teneurs en composés traces organiques n'ont pas été mesurées dans la préparation fongique JUMSTART WP. Cependant, compte tenu de sa composition et de son procédé de fabrication, il n'est pas attendu de contamination du produit par des micropolluants organiques.

Par ailleurs, les analyses microbiologiques disponibles montrent que la préparation fongique respecte les critères en vigueur pour l'homologation.

Aucune étude toxicologique n'a été réalisée avec la préparation fongique JUMSTART WP.

Des études de toxicité aiguë par voie orale, cutanée et par inhalation ainsi que des études d'irritation oculaire et cutanée ont été menées sur un produit contenant uniquement la souche P201. Les résultats montrent une absence de toxicité.

Aucune étude n'a été réalisée sur l'infectiosité et la pathogénicité des souches de microorganisme. Cependant, une recherche bibliographique récente ne révèle aucune publication relative à un problème de santé posé par *Penicillium bilaii* ou sa présence chez des sujets immunodéprimés. Par ailleurs, les infections confirmées à Penicillium sont rares et seul *Penicillium marneffei* est connu pour posséder un réel pouvoir pathogène à l'origine d'infections disséminées décrites essentiellement chez le patient porteur du virus de l'immunodéficience humaine. Enfin, une étude fournie par le pétitionnaire montre que les souches P201 et P208 ont une température optimale de croissance à 28-29°C, e t la littérature rapporte que la viabilité des spores de *P. bilaii* diminue notablement au-delà de 40°C.

Des données de la littérature (Mycopathologia 127: 19-27, 1994. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50. M.E. Savard, J.D. Miller, L.A. Blais, K.A. Seifert et R.A. Samson) démontrent que ce champignon ne produit pas de métabolites secondaires toxiques.

Au sens du règlement (CE) n° 1272/2008 [5], la classification toxicologique pour le produit, déterminée au regard des données toxicologiques disponibles sur le produit contenant la souche P201 et de la classification des matières premières, est « non classé ». Néanmoins, s'agissant d'une matière fertilisante à base de microorganismes, la phrase de précaution « Contient *Penicillium bilaii*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » devra être mentionnée sur l'étiquette.

Par ailleurs, un masque anti-aérosol (de type EN149 FFP3 ou équivalent), des gants et un vêtement de protection appropriés devront être portés pendant toutes les phases du traitement des semences.

[5] Règlement (CE) n° 1272/2008 = Règlement du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges.

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES AUX RESIDUS ET A L'EXPOSITION DU CONSOMMATEUR

Considérant les usages revendiqués en traitement de semences, la présence des souches P201 et P208 de *P. bilaii* dans les parties consommables n'est pas attendue. Par conséquent, il n'est pas attendu de risque pour le consommateur dans les conditions revendiquées d'utilisation de la préparation JUMPSTART WP.

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES AU DEVENIR ET AU COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT ET A L'ECOTOXICITE

Aucun test d'écotoxicité ni aucun essai visant à mesurer l'impact environnemental du produit JUMPSTART WP n'a été effectué. Toutefois, sur la base de la nature des matières premières et du procédé de fabrication, la classification environnementale proposée pour le produit JUMPSTART WP, est « non classé » au sens du règlement (CE) n°1272/2008.

Le microorganisme *Penicillium bilaii* est un saprophyte naturellement présent dans les sols et vivant préférentiellement dans la rhizosphère des plantes. Les éléments bibliographiques présentés dans le dossier indiquent que la population microbienne retrouve son niveau initial après la récolte. De plus, la colonisation spatiale des champignons de type *Penicillium* est, en général, limitée.

En outre, compte tenu de l'usage du produit (traitement de semences) un transfert des souches P201 et P208 vers les milieux aquatiques n'est pas attendu. L'impact du produit JUMPSTART WP à court terme sur l'environnement est considéré comme acceptable.

CONSIDERANT LES INFORMATIONS RELATIVES A L'EFFICACITE DU PRODUIT

Caractéristiques biologiques du produit

Effet revendiqué

L'effet revendiqué pour la préparation microbienne JUMPSTART WP concerne l'amélioration de la solubilisation du phosphore des sols favorisant le prélèvement de cet élément par les plantes.

Mode d'action et éléments relatifs à l'efficacité intrinsèque

La revendication du produit est basée sur l'activité du microorganisme *Penicillium bilaii*, connu pour son activité solubilisatrice du phosphore.

La capacité de l'inoculum de *P. bilaii* à améliorer la nutrition des plantes par solubilisation du phosphore est décrite dans une synthèse bibliographique. Elle cite essentiellement des travaux canadiens qui montrent que certains microorganismes, et en particulier des *P. bilaii*, ont la capacité de solubiliser le phosphore et d'améliorer la nutrition des plantes. *P. bilaii* agirait également sur les racines de la plante hôte en augmentant la proportion de racines porteuses de poils absorbants.

Selon le pétitionnaire, *P. bilaii* colonise les racines des plantes et accroît la biodisponibilité du phosphate des sols permettant une meilleur absorption et utilisation de cet élément par la plante. Le produit JUMPSTART WP ne peut se substituer à la fertilisation phosphatée pour couvrir les besoins des cultures, mais permet une réduction des apports de phosphate.

Essais d'efficacité

La démonstration de l'efficacité s'appuie sur des travaux décrits dans des publications scientifiques ainsi que des essais réalisés en plein champ.

Essais d'efficacité en conditions contrôlées

Des expérimentations conduites sous abri et en plein champ, ont montré une augmentation de la production de matière sèche et de l'absorption du phosphate par des cultures de blé *(Triticum aestivum)*, de pois *(Phaseolus vulgaris)* et de colza *(Brassica napus L.)* en présence de *P. bilaii* et d'une source de phosphate minéral.

Des essais d'efficacité réalisés au Canada sur du colza avec un inoculant à base de *P. bilaii* ont montré une croissance plus importante, une meilleure absorption du phosphate et une augmentation de la taille des grains des plants traités.

Essais en conditions d'emploi préconisées

Le demandeur présente des essais d'efficacité mis en place selon les conditions d'emploi préconisés sur culture de maïs, de blé, d'orge et de colza.

<u>Maïs</u>
Six essais ont été réalisés en France (2 essais), en Italie (1 essai) et en Espagne (3 essais) en 2011. Les souches de *P. bilaii* (P201 et P208) ont été testées :

- individuellement à différentes concentrations (10^4 et 10^6 ufc par grain) ;
- en combinaison (10^4 ufc par grain pour chaque souche) ;
- avec ou sans apport de phosphate au sol.

Dans 5 des 6 essais présentés, aucune différence de rendement n'est observée entre les différentes modalités ou les différences observées ne sont pas cohérentes. Dans un essai, en absence de fertilisation phosphatée ou avec une fertilisation phosphatée réduite, l'association des souches P201 (10^4 ufc par grain) et P208 (10^4 ufc par grain) entraine une augmentation du rendement.
Par ailleurs, aucun signe de phytotoxicité n'est observé en présence du champignon *Penicillium bilaii*.

En conséquence, les essais soumis permettent de démontrer l'efficacité du produit JUMPSTART WP sur une culture de maïs.

<u>Blé</u>
Quatre essais ont été réalisés (2010) en France (un essai) et en Espagne (3 essais) avec une préparation différente de JUMPSTART WP, ne contenant que la souche P201 (préparation PSOL). Trois doses de phosphate (0, 50 et 100%) et trois doses de la préparation (10^4, 10^5 et 10^6 ufc par grain) ont été testées.

L'absence de reproductibilité des résultats de ces essais ne permet pas de conclure à un effet du produit PSOL sur le rendement en grains, le poids de mille grains et le poids spécifique des grains.

<u>Orge</u>
Deux essais ont été réalisés en Espagne (saison 2009-2010) pour tester une dose de *P. bilaii*, souche P201 (10^3 ufc.g^{-1}), avec trois doses de phosphate (0, 20 et 40 kg.ha^{-1}) sur orge.

Les essais soumis ne permettent pas de juger de l'effet revendiqué.

<u>Colza</u>

Deux essais ont été réalisés en France (saison 2009-2010), un seul ayant pu être conduit jusqu'à la récolte (l'autre essai a été détruit par le froid hivernal).

Les résultats de cet essai montrent que l'apport du produit JUMSTART WP se traduit par une augmentation significative du rendement d'autant plus importante que la fertilisation phosphatée est faible**.** En revanche, l'apport du produit est sans effet sur le poids de mille grains.

En conséquence, ces résultats permettent de démontrer l'efficacité du produit JUMPSTART WP sur une culture de colza.

Conclusions sur le mode d'emploi du produit

Le mode d'emploi indiqué est suffisant pour permettre une bonne utilisation du produit JUMPSTART WP.

La préparation mise en solution doit être utilisée dans un délai de 6 heures.

Revendication et dénomination de classe et de type retenues

La revendication relative à l'amélioration de la solubilisation du phosphore des sols présentée par le pétitionnaire peut être considérée comme soutenue uniquement pour des applications sur maïs et colza.

Aucune mention relative à un effet sur la vigueur des plantes ne devrait être faite sur les supports d'information et de communication.

La dénomination de classe et de type proposée est la suivante : « Préparation fongique » - « Poudre d'inoculum de *Penicillium bilaii*, souches P201 et 208, pour enrobage de semences ».

CONCLUSIONS

En se fondant sur les données soumises par le pétitionnaire et évaluées dans le cadre de cette demande, ainsi que sur l'ensemble des éléments dont elle a eu connaissance, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que :

A. La caractérisation de la préparation fongique JUMPSTART WP ainsi que la constance de composition sont établis de manière satisfaisante.

Au regard des données de l'étude de stabilité, la durée de stockage chez l'utilisateur ne devra pas excéder 25 semaines dans les conditions spécifiées par le demandeur (température inférieure à 20℃, à l'abri de la lumière directe d u soleil).

L'élément de caractérisation retenu pour le marquage obligatoire est la teneur en inoculum fongique. En outre, le genre, l'espèce et les souches de microorganismes, ainsi que la date limite d'utilisation optimale de la préparation devront être précisés sur l'étiquette.

B. L'innocuité de la préparation fongique JUMPSTART WP pour l'usage demandé est considérée comme conforme aux exigences réglementaires.

Classification de la préparation fongique, phrases de risque et conseils de prudence

La préparation fongique est « non classé » au sens du Règlement (CE) n°1272/2008.

Précautions d'emploi

La mention « Contient *Penicillium bilaii*. Les microorganismes peuvent provoquer des réactions de sensibilisation » doit être indiquée sur l'étiquette.

Port d'un masque anti-aérosol (de type EN149 FFP3 ou équivalent), de gants et vêtements de protection appropriés par l'utilisateur pendant toutes les phases du traitement de semences.

C. L'efficacité de la préparation microbienne JUMPSTART WP relative à la solubilisation du phosphate de sol est jugée satisfaisante uniquement pour des applications sur maïs et colza. Les

essais soumis sur blé tendre, blé dur et orge ne permettent pas de démontrer l'efficacité du produit JUMPSTART WP sur ces cultures.

La dénomination de classe et de type proposée est la suivante : « Préparation fongique » - « Poudre d'inoculum de *Penicillium bilaii*, souches P201 et 208, pour enrobage de semences ».

Usages et conditions d'emploi retenus

Cultures	Quantité de semences inoculées avec une bouteille de 80 g	Quantité de semences inoculées avec une bouteille de 400 g	Nombre de germes par hectare ($ufc.ha^{-1}$)		Nombre d'apport par an	Volume de dilution (L)		Epoque d'apport	Délai maximal avant semis (semence nue)
			minimal	maximal		bouteille de 80 g	bouteille de 400 g		
Maïs	1120000 grains	5600000 grains	$4,7.10^{9}$	$5,4.10^{9}$	1	3,92	19,6	Au semis	70 jours
Colza	90 kg	455 kg	$9,0.10^{8}$	$1,9.10^{9}$		2	10		60 jours

Aucune mention relative à un effet sur la vigueur des plantes ne devrait être faite sur les supports d'information et de communication.

En conséquence, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail émet un avis **favorable** à la demande de mise sur le marché de la préparation fongique JUMPSTART WP et propose une homologation dans les conditions d'étiquetage et d'emploi précisées ci-dessus.

Données post-autorisation

Les compléments d'information suivants devront être apportés au plus tard 6 mois avant l'échéance de l'autorisation de mise sur le marché, sauf indications contraires précisées ci-dessous :

Type	Compléments post-homologation requis
Analyses	Effectuer au moins tous les six mois, sur des échantillons représentatifs de la matière fertilisante telle qu'elle est mise sur le marché et selon les méthodes prévues par le programme COFRAC 108 ou spécifiées ci-après, des analyses portant au moins sur : - les éléments figurant sur l'étiquetage (dénombrement des spores) ; - les microorganismes totaux, Entérocoques, *Escherichia coli, Clostridium perfringens, Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, Nématodes, Levures et moisissures, *Aspergillus, Pythium*. Les analyses doivent avoir été effectuées par un laboratoire accrédité par le COFRAC sur le programme 108 ou par un organisme équivalent (norme NF ISO 17025). Les méthodes d'analyse doivent être en priorité celles du programme 108 du COFRAC. L'emploi de toute autre méthode doit être justifié et il convient d'utiliser en priorité les méthodes normalisées ou standardisées. Le cas échéant, fournir la méthode utilisée, sa justification ainsi que les éléments nécessaires à sa validation. Dans tous les cas, les références des méthodes employées doivent être précisées.
Efficacité	Fournir des essais d'efficacité sur maïs et colza, dans les conditions pédoclimatiques françaises, selon les usages et conditions d'emploi retenus. Les essais devront démontrer que l'application du produit en enrobage des semences permet (i) d'améliorer la solubilisation du phosphore du sol, (ii) de réduire les apports de phosphore, (iii) d'améliorer l'assimilation du phosphore par les plantes. Les rapports d'étude, les données brutes et l'analyse statistique des résultats de ces essais devront être communiqués dans un délai de 4 ans.

Marc MORTUREUX

Mots-clés : JUMPSTART WP - *Penicillium bilaii* souches P201 et P208 - enrobage de semences - FSIM.